

TALITA DE CASTRO ALVES

**Rapid diagnosis of Zika virus through saliva and urine by
Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)**

São Paulo
2018

TALITA DE CASTRO ALVES

**Rapid diagnosis of Zika virus through saliva and urine by
Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)**

Original Version

Thesis presented to the Faculty of Dentistry of the University of São Paulo by the Graduate Program in Dental Sciences to obtain the title of Doctor in Science.

Concentration: Oral pathology and special needs Patients

Mentor: Prof. Dr. Marina Gallottini

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Alves, Talita de Castro.

Rapid diagnosis of Zika vírus through saliva and urine by Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) / Talita de Castro Alves ; mentor Marina Gallotini -- São Paulo, 2018.

66p. : fig., tab.; 30 cm.

Thesis (Doctorate) – Graduate Program in Dental Science. Concentration Area : Oral pathology and special needs patients. – Faculty of Dentistry of University of São Paulo.

Original version

1. Zika Virus. 2. Saliva. 3. LAMP. 4. Flavivirus. 5. RNA. I. Gallotini, Marina. II. Title.

Alves TC. Rapid diagnosis of Zika virus through saliva and urine by Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) [thesis] presented to the Faculty of Dentistry of the University of São Paulo to obtain the title of Doctor of Science.

Approved in: / / 2018

Examination Board

Prof. Dr. _____

Institution: _____ Verdict: _____

Prof. Dr. _____

Institution: _____ Verdict: _____

Prof. Dr. _____

Institution: _____ Verdict: _____

ACKNOWLEDGEMENT

First of all, I would like to thank my family. My parents Marcos and Neide, my brother Marcos, my sister-in-law Glaura and specially my husband Moisés, for the support and incentive during this work.

To my mentor, Prof. Dr. Marina Gallottini. Thank you for all those years of teaching. You are an important part of my professional, intellectual and personal development.

To the Zika team, from the New York University, College of Dentistry, Dan, Bill, Cheryl and Maite, for the support, learning and partnership.

A special thanks to Prof. Dr. Daniel Malamud. Thank you for letting me be a member of your team and for having shared your knowledge.

And a second special thanks to my dear colleague and friend Dr. Maite. Thank you for the learning, kindness, patience and friendship.

To the team from the University of São Paulo Tropical Medical Institute, specially to Prof. Dr. Paulo Braz for the guidance and partnership.

To the professors of the Stomatology Department of the University of São Paulo, School of Dentistry, Karem, Suzana, Marília, Décio and Fábio.

To the team from the Special care dentistry Center at the University of São Paulo, College of Dentistry, for the professionalism, care and friendship.

To the friends who, during this PhD, helped and supported me.

To CAPES foundation for the financial support during the PhD.

To the subjects who accepted to participate in this study.

And last but not least, I thank the University of São Paulo for all these amazing years of learning.

*"I alone cannot change the world,
but I can cast a stone across the waters to create many ripples."*

Mother Teresa

RESUMO

Alves TC. Rápido diagnóstico do Zika vírus na saliva e na urina através da amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Original.

O Zika vírus (ZIKV) é um vírus RNA de fita única, pertencente à família *Flaviviridae*. É transmitido entre os humanos geralmente pelos mosquitos da espécie *Aedes*, mas transmissão via sexual, perinatal e por transfusão sanguínea também foram relatadas. Os sintomas aparecem em 20% dos indivíduos infectados e incluem febre, dor de cabeça, rash cutânea, conjuntivite, mialgia e artralgia. Em 2016, durante a grande epidemia do ZIKV pelas Américas, o interesse pelo seu diagnóstico rápido se intensificou, devido a relação do vírus com o aumento da incidência de casos da síndrome de Guillain-Barré em adultos e da microcefalia em recém nascidos de mulheres grávidas infectadas. De acordo com o CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) o diagnóstico dos pacientes sintomáticos deve ser realizado através da detecção dos ácidos nucleicos do vírus por PCR (*Polymerase chain reaction*) em amostras pareadas de sangue e urina. Estudos recentes têm postulado que a saliva é uma alternativa importante para detecção do ZIKV. A saliva requer menor complexidade no processamento quando comparada ao sangue, simplificando a reação. A amplificação Isotérmica mediada por Loop (LAMP) é um teste sorológico de alta sensibilidade e especificidade para detectar rapidamente DNA ou RNA de patógenos, incluindo o ZIKV. O fato de não requerer ciclos térmicos como o PCR, faz do LAMP uma reação mais simples, rápida e mais econômica por exigir menos energia. O objetivo deste estudo foi de avaliar e comparar a eficácia da saliva e da urina em diagnosticar a infecção pelo Zika vírus em indivíduos na fase aguda da doença, através da detecção do RNA viral por meio do LAMP. Ao todo, 131 amostras (68 saliva e 63 urina) de 69 indivíduos brasileiros apresentando sinais e sintomas específicos e confirmados positivamente para o ZIKV através da análise do sangue por PCR, foram coletadas e analisadas por LAMP. A média de idade dos indivíduos foi de 34,7 ($\pm 13,6$), sendo 46 (66,7%) do sexo feminino. Das 68

amostras de saliva analisadas por LAMP, 45 (66,2%) foram positivas para o ZIKV com o Tempo de positividade (Tp) médio de 13,5 minutos. Enquanto que das 63 amostras de urina, 25 (39,7%) foram positivas com o Tp médio de 15,8 minutos. A saliva pôde diagnosticar mais indivíduos ($p=0.0042$) e em menor Tp ($p=0.0176$) quando comparada à urina. A saliva demonstrou ser uma alternativa viável no diagnóstico da infecção do ZIKV, em indivíduos na fase aguda da doença, através do LAMP. Nossos achados contribuem para o conhecimento do comportamento do Zika vírus no organismo, uma vez que pouco se conhece em relação à excreção do ZIKV na saliva.

Palavras-chave: Zika vírus. Saliva. LAMP. Diagnóstico. Flavivírus. RNA.

ABSTRACT

Alves TC. Rapid diagnosis of Zika virus through saliva and urine by Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Original.

Zika virus (ZIKV) is a single-stranded RNA virus, member of the *Flaviviridae* family. It is transmitted among humans usually by *Aedes* mosquito species, but sexual transmission, perinatal and blood transfusion have also been reported. Symptoms appear in 20% of infected individuals and include fever, cutaneous rash, headache, conjunctivitis, myalgia and arthralgia. In 2016, during the Americas ZIKV outbreak, the interest in a rapid diagnosis intensified due to a sudden increase in cases of Guillain-Barré syndrome in adults and microcephaly in newborns of infected pregnant women related with ZIKV. According to CDC (Center for Disease Control and Prevention) the diagnosis of symptomatic patients should be done through nucleic acid detection by PCR (Polimerase Chain Reaction) in paired samples of blood and urine. Recent studies have reported that saliva can be an important alternative to detect ZIKV. Saliva requires less processing than blood, which greatly simplifies the assay process. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) is a molecular test with high sensibility and specificity for rapid detection of DNA or RNA of pathogens, including ZIKV. The fact that LAMP does not require thermal cycling makes the assay simple, fast and cost effective compared to PCR assay. The aim of this study was to evaluate the efficacy of saliva and urine to diagnose ZIKV infection in subjects during the acute phase, through ZIKV RNA detection by LAMP. A total of 131 samples (68 saliva and 63 urine) from 69 subjects in the acute phase of ZIKV infection and confirmed positive for ZIKV by blood analysis through PCR were collected and analyzed by LAMP. The mean age of the individuals was 34.7 (± 13.6) years old, of whom 46 (66.7%) were females. From the 68 saliva samples, 45 (66.2%) were positive for ZIKV with an average time to positivity (Tp) of 13.5 minutes, and from the 63 urine samples, 25 (39.7%) were positive with an average Tp of 15.8 minutes. Saliva detected more samples ($p=0.0042$) and had faster Tp ($p=0.0176$) as compared to urine.

Thus, saliva proved to be a feasible alternative for diagnosis of ZIKV infection during the acute phase by LAMP. The findings of this study can contribute to the knowledge of the Zika virus behavior in the human organism, since this issue is not totally understood.

Keywords: Flavivirus. Virology. Polymerase chain reaction. RNA. Infection. Dengue. Aedes. Saliva. LAMP. Zika

LIST OF FIGURES

Figure 2.1	Zika virus genome structure	25
Figure 2.2	LAMP primers for the sequences of the target gene.....	29
Figure 2.3	LAMP assay showing the primers (FIP, BIP, Loop F and Loop B) functionality.	29
Figure 2.4	Genie III® (Optigene®, UK, 2014)	30
Figure 4.1	Salivette® used to collect non-stimulated saliva	34
Figure 5.1	Number of positive samples of saliva and urine and the p-value (Chi-square test).....	38
Figure 5.2	Time to positivity (Tp) between saliva and urine samples with the mean and p-value (t-test).	39

LIST OF TABLES

Table 4.1	Zika virus capsid primers sequence and optimized concentration	35
Table 5.1	Demographic data.....	37
Table 5.2	Test of limit of detection of ZIKV through LAMP	37

LIST OF ACRONYMS

CDC	Center of Disease Control and Prevention
DENV	Dengue virus
DNA	Deoxyribonucleic acid
GBS	Guillian-Barré syndrome
LAMP	Loop-mediated Isothermal Amplification
p	p value
RNA	Ribonucleic acid
RPM	Rotations per minute
Tp	Tempo para positividade
vp	viral particles
WHO	World Health Organization
ZIKV	Zika virus

LIST OF SIMBOLS

°C Degrees Celsius

µL Microliters

mL Milliliters

CONTENTS

1	INTRODUCTION	23
2	REVIEW OF LITERATURE.....	25
2.1	Zika Virus.....	25
2.2	Zika virus in saliva.....	27
2.3	Zika virus in urine	27
2.4	Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)	28
2.4.1	Genie III.....	30
3	OBJECTIVE	31
4	MATERIALS AND METHODS	33
4.1	Ethics standards.....	33
4.2	Saliva and urine samples collection	33
4.3	LAMP analysis of ZIKV RNA	34
4.3.1	Dengue virus cross-reactivity and Limit of Detection tests	35
4.4	Statistical analysis.....	36
5	RESULTS	37
6	DISCUSSION	41
7	CONCLUSIONS	43
	REFERENCES	45
	APPENDIX	49
	ATTACHMENTS	51

1 INTRODUCTION

Zika virus (ZIKV) is a single-stranded RNA virus, member of the *Flaviviridae* family (1). It is transmitted among humans usually by *Aedes* mosquito species, but sexual transmission (2), perinatal (3) and blood transfusion (4) have also been reported.

During the acute phase, symptoms appear in 20% of infected individuals and include fever, cutaneous rash, headache, conjunctivitis, myalgia and arthralgia (5). After the Americas ZIKV outbreak occurred in 2016, a sudden increase in microcephaly and Guillain-Barré syndrome (GBS) related with ZIKV infection prompted the World Health Organization (WHO) to declare a public health emergency of international concern (6, 7). In Brazil, the high number of microcephaly and deaths of newborns of mothers infected during pregnancy, made WHO include ZIKV as a teratogenic agent (8, 9).

ZIKV RNA disappears from blood in about one week after infection, however the virus remains sequestered up to 29 days in saliva (5) and urine (10). Since the first report of ZIKV in saliva (11), studies have suggested that saliva could be an important alternative sample to detect ZIKV infection (5, 11-14). Saliva collection is easy, non-invasive, safe handling and requires less processing than blood greatly simplifying the assay, justifying the efforts to develop diagnostic techniques through the use of this fluid.

According to CDC (Center for Disease Control and Prevention) recommendation the diagnosis of ZIKV infection in symptomatic patients should be done through nucleic acid detection by PCR (Polimerase Chain Reaction) in paired samples of serum and urine. Urine collection is also easy and non-invasive and studies reported that ZIKV RNA can be frequently detected in urine during the acute phase (15).

Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) has high sensitivity and specificity, and can detect RNA and DNA without thermal cycling. The assay uses specific primers and generate real-time amplification that can be detected in less than 30 min. These characteristics make LAMP assays ideal to use in portable devices

which can be configured to diagnose diseases at point of care facilities (16, 17). Therefore, the detection of ZIKV RNA by LAMP provides the basis of a test that can readily facilitate the diagnosis of new cases.

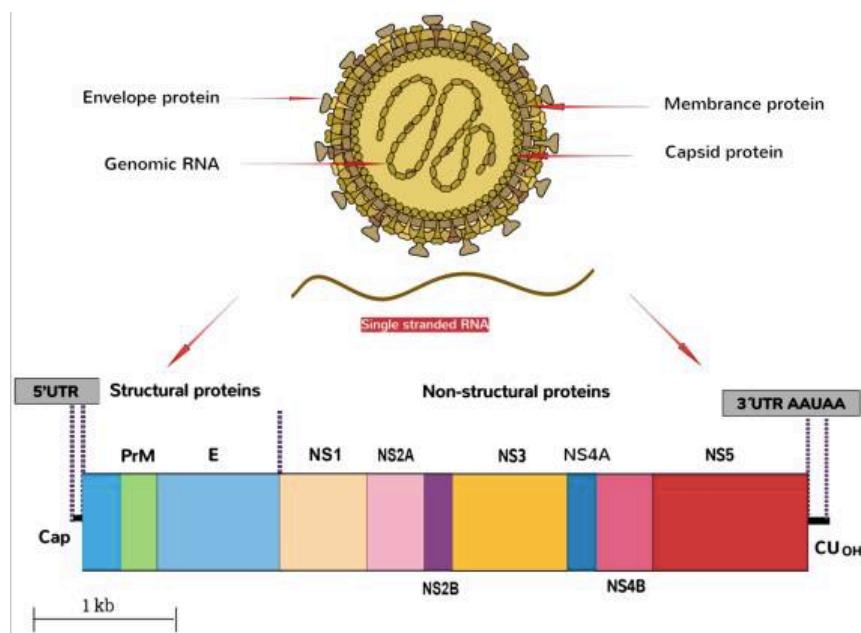
The aim of this study was to evaluate and compare the efficacy of saliva and urine to diagnose ZIKV infection in subjects during the acute phase, utilizing LAMP to detect ZIKV RNA.

2 REVIEW OF LITERATURE

2.1 Zika virus

Zika virus (ZIKV) is a single-stranded RNA virus, member of the *Flaviviridae* family (1). The ZIKV has an icosahedral, enveloped and non-segmented RNA genome that encodes seven non-structural (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4, NS4B and NS5) and three structural proteins (C, prM, E) (Figure 2.1) (18).

Figure 2.1 - Zika virus genome structure (18)



ZIKV is transmitted among humans usually by *Aedes* mosquito species, mainly by *Aedes aegypti* (1), although sexual (2), perinatal (3), and blood transfusion (4) transmission were already reported. The ZIKV RNA disappears from the systemic circulation in approximately one week, but the virus remains for longer periods (i.e. more than 29 days) in saliva (5) and urine (10).

According to CDC (Center for Disease Control and Prevention) recommendation the diagnosis of ZIKV infection in symptomatic patients should be done through nucleic acid detection (Polimerase chain reaction) in paired samples of serum and urine (9).

ZIKV was firstly isolated in 1947 from a Rhesus monkey in the Zika Forest, Uganda, Africa. In 1964, Nigeria reported the first infection of ZIKV in humans. Since 2005, cases of ZIKV have been reported in Africa and Asia (19, 20). In 2007, a ZIKV outbreak in Micronesia was characterized by rash, arthralgia and fever symptoms in the infected individuals (21). Subsequently, in 2013 and 2014, ZIKV was identified in Oceania causing mild clinical symptoms (22). More recently, in 2015, the first cases of Zika were reported in Brazil. In November 2015, Brazil declared a national public health emergency due to the number of infected individuals and due to the increase in congenital microcephaly and other nervous system malformations among newborns related to the ZIKV infection (9).

The incubation period (the time from exposure to symptoms) of Zika virus disease is estimated to be 3–14 days. The majority (80%) of people infected with ZIKV do not develop symptoms. Symptoms appear during the acute phase and are generally mild including fever, rash, conjunctivitis, muscle and joint pain, and headache, and usually last for 2 to 7 days (9, 21). The complications of Zika virus infection can appear during pregnancy causing microcephaly and other congenital abnormalities in the developing fetus and newborns. Zika infection in pregnancy also results in pregnancy complications such as fetal loss, stillbirth, and preterm birth. Since French Polynesia in 2013, the Guillain-Barré syndrome (GBS) has been also related to the virus (6, 9).

In the Brazilian cases, besides the GBS in adults, congenital microcephaly and central nervous system malformation were also related to newborns of mothers infected during pregnancy (5, 12, 23). In 2016, Brazil reported 3,893 cases of microcephaly, including 49 deaths, which made WHO include ZIKV as a teratogenic agent (8, 9).

2.2 Zika virus in saliva

The first detection of ZIKV in saliva occurred during the French Polynesia outbreak in 2013. Musso et al. (11) observed that individuals presenting specific symptoms of ZIKV infection had a negative blood test through qPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction). The researchers decided to collect a sample of saliva from a 1 year-old child with specific ZIKV symptoms and the sample was positive (11). Since then, studies have been suggested that saliva could be an important alternative sample to detect ZIKV infection (5, 11-14).

ZIKV can be detected at high concentration in saliva during the acute phase (i.e. 5 to 7 days after infection) during manifestation of symptoms (10, 11). Barzon et al. (5), using qPCR assay, reported a persistence of ZIKV of up to 29 days in saliva and urine and of up to 10 days in blood. The authors also reported that the viral load were higher in saliva than in urine and blood (5).

Saliva collection is easy, non-invasive and requires less processing than blood, thus greatly simplifying the assay, justifying the efforts to develop diagnostic techniques using the use of this fluid (11).

Bonaldo et al. (12), reported the presence of viable virus in saliva samples, suggesting that it could be a transmission route among humans, mainly in cases of oral wounds or severe periodontal diseases (12). Musso et al. (11) also pointed out the potential transmission through saliva after isolating ZIKV in Vero cell culture of saliva samples collected from acute phase individuals (11, 12).

2.3. Zika virus in urine

Urine testing is non-invasive and is an attractive sample for diagnostic testing in which blood collection can be difficult. This may include young children,

neonates, elderly or patients who present with small, dehydrated, or elusive veins. Sample collection can also be done at field locations where trained medical personal or facilities may be lacking, and allow for self-collection within communities for surveillance or epidemiology studies during an outbreak (10-12, 15, 24).

ZIKV is detectable for a longer time post-infection in urine than serum. The CDC recommends that urine samples should be collected in patients suspected of ZIKV infection and that molecular testing of urine should be performed in conjunction with serum testing (10-12, 15, 24).

2.4 Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)

Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) has high sensitivity and specificity, enabling detection of RNA and DNA without thermal cycling. The assay was firstly described by Notomi et al. (25), and through the use of primers designed to target the capsid gene, LAMP generates real-time amplification that can be detected in less than 30 minutes (25).

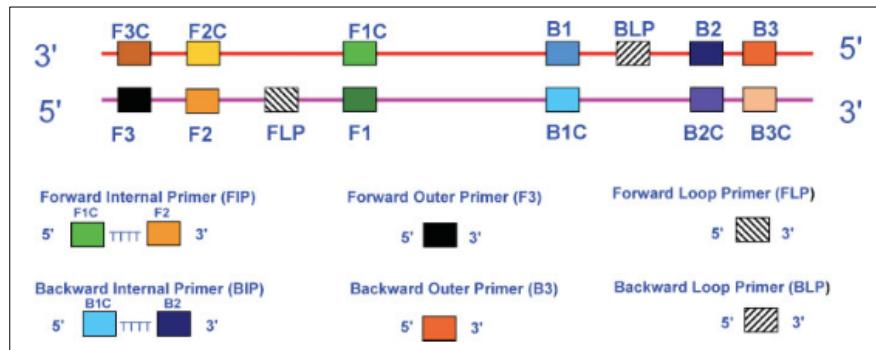
The fact that LAMP does not require thermal cycling makes the assay simple, fast and cost effective compared to PCR assay (26, 27). These characteristics make LAMP assays ideal to use in portable devices which can be configured to diagnose diseases at point of care facilities (16, 17). Thus, the detection of ZIKV RNA by LAMP provides the basis of a test that can readily facilitate the diagnosis of new cases.

Previously published studies demonstrated the efficacy of RT-LAMP compared to qPCR (quantitative polymerase chain reaction) for Zika virus detection (28-31). The LAMP assay has shown to be useful to detect the ZIKV RNA in saliva and urine samples (32-34). LAMP has better sensitivity and specificity compared to qPCR, offering a higher limit of detection and eliminating the risk of cross-reactivity with other flaviviruses (17, 27, 35).

Under isothermal conditions, LAMP employs a set of six specially designed primers spanning eight distinct sequences of a target gene. Two outers primers (F3

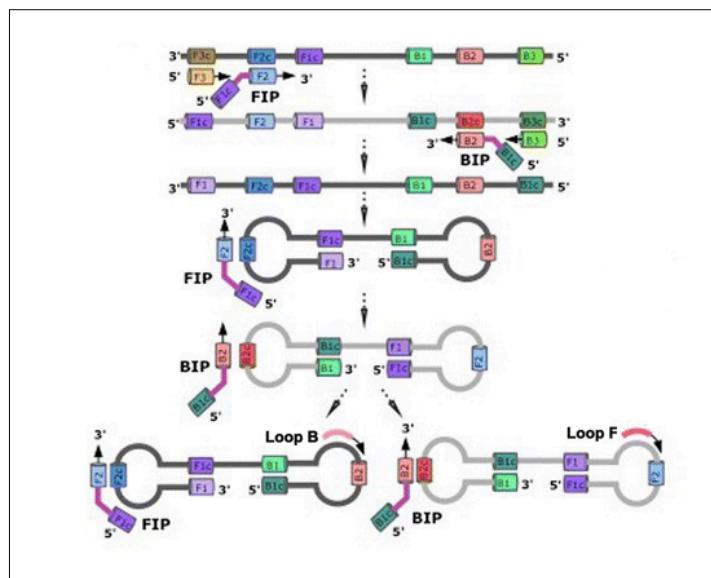
and B3), two inner primers (FIP and BIP) and two Loop primers (Loop F and Loop B) (Figure 2.2) (36).

Figure 2.2 - LAMP primers for the sequences of the target gene (36).



The reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) is initiated by adding internal primers (FIP or BIP) that anneal to regions (F2c or B2c) within the target RNA. The outer primer (F3 or B3) then hybridizes to its priming site (F3c or B3c) on the target RNA and initiates the formation of self-hybridizing loop structures by strand invasion of the DNA sequences already extended from the inner primers (FIP and BIP), resulting in a dumbbell structure. Moreover, RT-LAMP process can be accelerated by loop primers (LF and LB) (Figure 2.3) (33).

Figure 2.3: LAMP assay showing the primers (FIP, BIP, Loop F and Loop B) functionality (33).

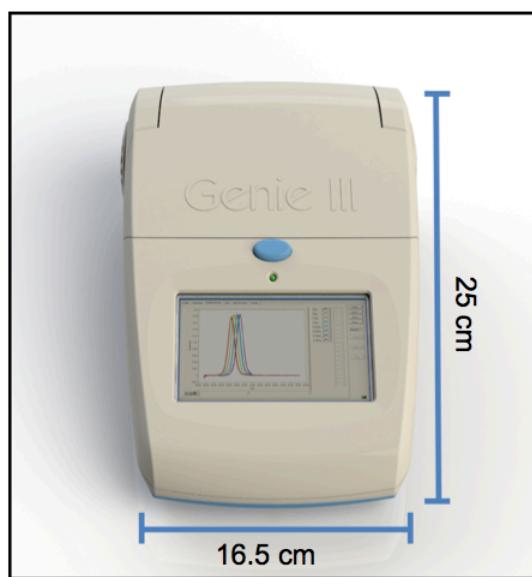


2.4.1 Genie® III

The Genie® III (OptiGene®, UK, 2014) is a compact and portable device that supports any isothermal DNA/RNA amplification method. It is a small, lightweight (1.75kg) and self-contained device which reduces the contamination risk of LAMP reactions (Figure 2.4). Genie® III accepts a single 8-microtube strip which is measured by a dual channel fluorescence detection system.

Its touchscreen panel allows to operating the assay and observing real time amplification together with time to positivity (Tp), which is the time required for the assay to start amplifying the target sequence, and annealing temperature (At), which is a specific and unique temperature of the primers binding with the target-sequence.

Figure 2.4 - Genie III® (Optigene®, UK, 2014), device used during LAMP assays.



3 OBJECTIVE

The aim of this study was to evaluate and compare the efficacy of saliva versus urine for diagnosing ZIKV infection in subjects during the acute phase using LAMP to detect ZIKV RNA.

4 MATERIALS AND METHODS

4.1 Ethics standards

This study was approved by the Ethics Committee of the University of São Paulo, School of Dentistry (1.774.973) (Attachments), by the National Ethics Committee for Research (CONEP-Brazil: 1.885.522) (Attachments) and by New York University Medical Center Institutional Review Board (H10-01894). All participants agreed to participate in the study and signed an informed consent form.

4.2 Saliva and urine samples collection

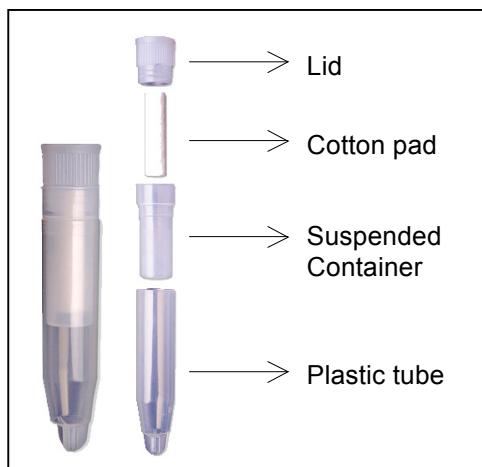
In total, 131 samples (68 of saliva and 63 of urine) were collected and analyzed from 69 Brazilian subjects of all ages who met the inclusion criteria as follows: presenting specific symptoms and signals of ZIKV infection (acute phase), such as fever, cutaneous rash, headache, conjunctivitis, myalgia and arthralgia; and confirmed positivity for ZIKV and negativity for Dengue and Chikungunya virus infections by blood analysis with qPCR, according to criteria described by Lanciotti et al. (37).

The samples were collected on the same day during the acute phase of the disease and the average days between the onset of symptoms and sample collection was 3.2 ± 2.9 days. Demographic and symptom information were compiled.

Unstimulated saliva was collected using a cotton pad (Salivette[®]) (Figure 4.1) placed under the tongue and left for a few minutes before being centrifuged (1000 rpm for 2 minutes) without the use of any buffer. The subjects were instructed to leave a urine sample in a specific collection tube. Female subjects were also instructed to perform previous hygiene to avoid contamination. Saliva and urine

samples were aliquoted, stored and shipped frozen at -80°C until analysis at New York University College of Dentistry.

Figure 4.1 - Salivette® used to collect non-stimulated saliva



4.3 LAMP analysis of ZIKV RNA

RNA purification and Reverse Transcriptase Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) were performed at New York University, College of Dentistry, in a Biosafety Level 2+ facility with appropriate safety procedures, as described in the CDC/NIH Biosafety (BMBL 5th Edition). RNA isolation was performed with a commercial kit (ZR Viral RNA kit. ZYMO® Research) using 300µL of saliva and 600µL of urine.

Primers targeting a unique sequence in the ZIKV capsid were designed by using the Primer Explorer V4 software (Eiken Chemical Co., Tokyo, Japan) for conserved regions of the capsid gene of the PLCal_ZV, Thailand strain (GeneBank accession no. KF993678.1). A set of three primer pairs (Table 4.1) including two outer primers (forward primer F3 and backward primer B3), two inner primers (forward inner primer FIP and backward inner primer BIP), and two loop primers (forward loop primer Loop F and backward loop primer Loop B), were selected. The primers were purified through HPLC purification, and were assessed for specificity,

with their concentration being optimized before LAMP assays. The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) was used against sequences in GenBank, indicating that they are ZIKV specific (35).

The RT-LAMP reaction mixture contained a total volume of 25µL; 15µL of Master Mix (Optigene®, UK), 0.5µl of 7.5 units of reverse transcriptase (WarmStart-RT, New England Biolabs Inc.), 2.5µl of primers (0.4µM of F3 and B3; 2.4µM of FIP and BIP; 1µM of Loop F and Loop B) and 7µl of template (purified RNA). Samples were kept chilled on ice until being placed in the LAMP reaction chamber. The amplification step (30 minutes at 65°C) was followed by an annealing curve analysis step (98-60°C, ramping at 0.05°C/sec; Genie III, OptiGene, UK). Positive and negative controls were used in all LAMP reactions. Every step of the RT-LAMP assay (i.e. time, temperature and concentration of the reagents) was previously optimized.

Table 4.1 – Zika virus capsid primers sequence and optimized concentration

Primer	5' → 3' nucleotides sequence	Optimized concentration (µM)
F3	GACTTCTGCTGGGTCAATG	0.4
B3	GCCAACAATTCCGACACTA	0.4
FIP	CCCCACTGAACCCATCTATTGGGTCTGGCGATTCTAGC	2.4
BIP	GTTCAAGAAAGATCTGGCTGCCCTCGTCTTTCTCCT	2.4
Loop F	GCTTGATTGCCGTGAATCTC	1.0
Loop B	GCTGAGAATAATCAATGCCAGG	1.0

4.3.1 Dengue virus cross-reactivity test and limit of detection test

The ZIKV primers were tested in duplicate for cross-reactivity against Dengue virus (DENV) RNA, serotype 1 (BEI, NR-82 Hawaii) and serotype 2 (BEI, NR-84 New

Guinea). Samples of uninfected saliva were spiked with ten-fold serial dilutions of ZIKV strain (PRVABC59, NR-50240, BEI Resources) to test the limit of detection of the LAMP reaction (35).

4.4 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS® and Bioestat® statistics software at significance level of 0.05. Chi-square, Lilliefors and Wilcoxon tests were used to compare the number of positive samples between saliva and urine and to correlated the results with age, sex, symptoms or signals and time of sample collection. T-tests were performed to calculate the difference of the time to positivity (Tp) between saliva and urine samples.

5 RESULTS

The mean age of the 69 participants was 34.7 (± 13.6) years old, of whom 46 (66.7%) were females. The most common related symptoms were cutaneous rash (56.5%), fever (49.3%), myalgia (49.3%), arthralgia (39.1%) and headache (36.2%) (Table 5.1).

Table 5.1 – Demographic data.

Characteristics	Participants (N=69)
Average Age (Range) - yr	34.7 (4 to 75)
Female Sex (#,%)	46 (66.7%)
Acute Phase Symptoms (#,%)	
Cutaneous rash	39 (56.5%)
Fever	34 (49.3%)
Myalgia	34 (49.3%)
Arthralgia	27 (39.1%)
Headache	25 (36.2%)

The samples spiked with DENV using both serotypes did not amplify with ZIKV primers, thus demonstrating their specificity. The limit of detection test demonstrated that the lowest detectable concentration of ZIKV in all replicates (100%) was consistently 2.2×10^3 RNA copies/milliliter (6.6 RNA copies/reaction). In 75% of the samples 2.2×10^2 RNA copies/milliliter (0.66 RNA copies/reaction) was detected (Table 5.2) (35).

Table 5.2 – Test of limit of detection of ZIKV through LAMP.

Samples of saliva infected with ZIKV		
ZIKV concentration (copies of RNA per milliliter)	LAMP reaction (copies of RNA per reaction)	Number of positive samples in 10 replicates
2.2×10^5	660.00	10/10 (100%)
2.2×10^4	66.00	10/10 (100%)
2.2×10^3	6.60	10/10 (100%)
2.2×10^2	0.66	7/10 (75%)
2.2×10^1	0.06	Non detectable (0%)
0	0.00	Non detectable (0%)

Of the 69 participants, 62 had their both saliva and urine tested. Twenty-one individuals were positive for both, 23 positive for saliva only and four positive for urine only (Appendix). RT-LAMP analysis showed that 45 (66.2%) of the 68 saliva samples were positive for ZIKV, whereas only 25 (39.7%) of the 63 urine samples were positive, resulting in a statistically significant difference between them ($p=0.0042$) (Figure 5.1).

The average time to positivity (Tp), which is the time required for the assay to start amplifying the target sequence, were 13.5 minutes for saliva and 15.8 minutes for urine, also resulting in a statistical difference between them ($p=0.0176$) (Figure 5.2). Saliva samples could diagnose faster than urine, even using half of the sample volume (300 μ L for saliva and 600 μ L for urine) to purify the RNA. When analysing the positivity of saliva and urine in the same patient, Tp was faster for the former in 71.4% (15/21) of the cases.

Additional analysis indicated that the Tp and the detection of ZIKV RNA in saliva and urine were not correlated with age, sex, symptoms or signals and time of sample collection ($p>0.05$).

Figure 5.1 – Number of positive samples of saliva and urine and the p-value (Chi-square test)

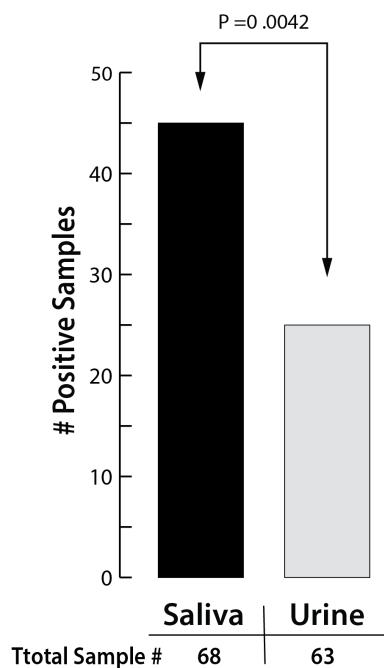
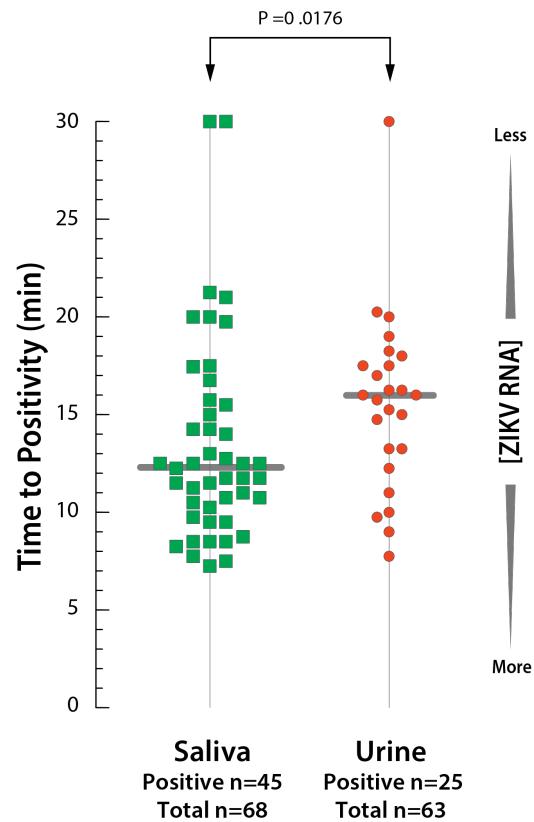


Figure 5.2 – Time to positivity (Tp) between saliva and urine samples with the mean and p-value (t-test).



6 DISCUSSION

In 2016, a major outbreak of Zika virus occurred in the Americas and consequently a sudden increase of microcephaly and GBS cases related to ZIKV had happened. In response, the WHO declared an international public health emergency, which required the development of a simple, fast and specific diagnostic method to identify new cases during the current and future epidemics.

Saliva collection is a simple procedure, being quick and noninvasive for the patient. In this study, saliva was shown to be a feasible alternative sample for diagnosis of ZIKV infection in acute-phase subjects by using Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay. ZIKV was detected 1.7 times more cases in saliva than in urine. Furthermore, the T_p was shorter in saliva and required much less sample volume compared to urine.

Previously published papers have already demonstrated the efficacy of RT-LAMP compared to qPCR (28-31). The LAMP assay has shown to be useful to detect the ZIKV RNA in saliva and urine samples (32-34). Nevertheless, most of these studies used spiked samples to demonstrate the specificity and the sensitivity of the assay. Our study proposed to analyze a significant number of saliva and urine samples from ZIKV-positive individuals. The higher number of samples and the fact that were used real samples instead of spiked ones may be the reason why we have observed different rates, mainly in urine samples which had a low positive rate in this study. Barzon et al. (5) used qPCR and observed prolonged shedding of ZIKV in saliva and urine up to 29 days in one patient, thus demonstrating that viral load is constantly changing during the first days of infection and in certain moments saliva showed higher concentration of ZIKV RNA (copies/mL) compared to urine (5).

By using specific primers, LAMP analysis demonstrated specificity to ZIKV and had no cross-reaction with Dengue virus, a common *flavivirus* in Brazil usually presenting diagnostic challenges due to cross-reactivity with ZIKV. The fact that LAMP does not require thermal cycling makes the assay simpler, faster and more cost-effective compared to PCR assay (26, 27).

The Genie III device (OptiGene, UK) used for the LAMP assay is a self-contained device which reduces the contamination risk of LAMP reactions.

Furthermore, in this study, positive and negative controls were used in all the reactions to avoid contamination problems. The advantage of observing the results by real-time allows the diagnosis in less than 30 minutes, so that treatment and care can start immediately to avoid transmission of the disease (38). Studies have already reported that Zika virus can be transmitted sexually (2), perinatally (3) and through blood transfusion (4). The sooner the patient knows about the infection, the sooner the care can be performed to avoid transmission.

Since the 2016 epidemics, no other country in the Americas has confirmed a case of ZIKV transmission. The last epidemiologic update in February 2017 demonstrated that 48 countries were affected with confirmed cases of ZIKV infection. The WHO estimated that over U\$100 million would be necessary to implement a prevention and treatment planning for the medical complications plan caused by ZIKV (9). The development of simple, feasible and cost-effective diagnostic techniques, such as LAMP associated with saliva samples would be helpful to use in epidemics as it enables the rapid diagnosis of new cases.

Although saliva appears to be a useful sample to diagnose ZIKV infection during the acute phase, other studies have reported a low risk of transmission through this fluid (12, 14, 39). Bonaldo et al. (12), reported viable virus in saliva samples, suggesting that only in cases of oral wounds or severe periodontal diseases the transmission could be possible (12). Saliva has a natural barrier (e.g. mucins, lysozymes, peroxidases and agglutinins) against pathogens, which make this fluid a low-risk contamination pathway, as can be seen in HIV and Influenza A viruses (40).

This study has shown ZIKV positivity in 66.2% (45 of 68) of the saliva samples, suggesting that ZIKV may not always be excreted through saliva. However, at the moment of the sample collection, ZIKV could be more often detected in saliva than in urine (25 of 63). The limitation of this study relies on its cross-sectional design, with the samples being collected at single time point. For further studies, to better understand the presence of the ZIKV RNA in saliva and urine, longitudinal studies following-up the patients and using a serial collection of samples at different times would be necessary.

7 CONCLUSIONS

The results of this study have allowed us to conclude the following:

- Saliva is a feasible alternative to rapid diagnose Zika virus infection by Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) in acute phase individuals.
- Zika virus may not always be excreted through saliva, but could be more often detected in saliva than in urine samples.
- The findings of this particularly study can contribute to the knowledge of the Zika virus behavior in the human organism, since this issue is not totally understood.

REFERENCES¹

1. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus Flavivirus. *J Virol.* 1998;72(1):73-83.
2. Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(2):359-61.
3. Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lormeau V, Musso D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill.* 2014;19(13).
4. Musso D, Stramer SL, Busch MP. Zika virus: a new challenge for blood transfusion. *Lancet.* 2016;387(10032):1993-4.
5. Barzon L, Pacenti M, Berto A, Sinigaglia A, Franchin E, Levezzo E, Brugnaro P, Palù G. Isolation of infectious Zika virus from saliva and prolonged viral RNA shedding in a traveller returning from the Dominican Republic to Italy, January 2016. *Euro Surveill.* 2016;2016(21):10.
6. Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparc-Goffart I, Lastere S, Valour F, et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill.* 2014;19(9).
7. Mlakar J, Korva M, Tul N, Popovic M, Poljsak-Prijatelj M, Mraz J, et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med.* 2016;374(10):951-8.
8. Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR. Zika Virus and Birth Defects--Reviewing the Evidence for Causality. *N Engl J Med.* 2016;374(20):1981-7.
9. Who.int [homepage on the internet] World Health Organization. <http://www.who.int/emergencies/diseases/zika/en/>.
10. Gourinat AC, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika virus in urine. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(1):84-6.

¹ According to Vancouver style.

11. Musso D, Roche C, Nhan TX, Robin E, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Detection of Zika virus in saliva. *J Clin Virol.* 2015;68:53-5.
12. Bonaldo MC, Ribeiro IP, Lima NS, Dos Santos AA, Menezes LS, da Cruz SO, et al. Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(6):e0004816.
13. Malamud D. Saliva as a diagnostic fluid. *Dent Clin North Am.* 2011;55(1):159-78.
14. Zuanazzi D, Arts EJ, Jorge PK, Mulyar Y, Gibson R, Xiao Y, et al. Postnatal Identification of Zika Virus Peptides from Saliva. *J Dent Res.* 2017;96(10):1078-84.
15. Paz-Bailey G, Rosenberg ES, Doyle K, Munoz-Jordan J, Santiago GA, Klein L, et al. Persistence of Zika Virus in Body Fluids - Preliminary Report. *N Engl J Med.* 2017.
16. Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J Microbiology (Seoul, Korea).* 2015;53(1):1-5.
17. Calvert AE, Biggerstaff BJ, Tanner NA, Lauterbach M, Lanciotti RS. Rapid colorimetric detection of Zika virus from serum and urine specimens by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *PLoS One.* 2017;12(9):e0185340.
18. Rather IA, Lone JB, Bajpai VK, Paek WK, Lim J. Zika Virus: An Emerging Worldwide Threat. *Front Microbiol.* 2017;8:1417.
19. Hayes EB. Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(9):1347-50.
20. Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;46(5):509-20.
21. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 2009;360(24):2536-43.

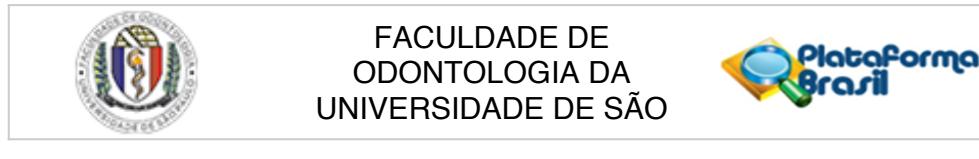
22. Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(10):O595-6.
23. de Oliveira WK, de Franca GVA, Carmo EH, Duncan BB, de Souza Kuchenbecker R, Schmidt MI. Infection-related microcephaly after the 2015 and 2016 Zika virus outbreaks in Brazil: a surveillance-based analysis. *Lancet.* 2017.
24. Lamb LE, Bartolone SN, Kutluay SB, Robledo D, Porras A, Plata M, et al. Advantage of urine based molecular diagnosis of Zika virus. *International urology and nephrology.* 2016;48(12):1961-6.
25. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(12):E63.
26. Zanolli LM, Spoto G. Isothermal amplification methods for the detection of nucleic acids in microfluidic devices. *Biosensors (Basel).* 2013;3(1):18-43.
27. Chotiwat N, Brewster CD, Magalhaes T, Weger-Lucarelli J, Duggal NK, Ruckert C, et al. Rapid and specific detection of Asian- and African-lineage Zika viruses. *Science translational medicine.* 2017;9(388).
28. Chen Z, Liao Y, Ke X, Zhou J, Chen Y, Gao L, et al. Comparison of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, conventional PCR and real-time PCR assays for Japanese encephalitis virus. *Mol Biol Rep.* 2011;38(6):4063-70.
29. Wang X, Seo DJ, Lee MH, Choi C. Comparison of conventional PCR, multiplex PCR, and loop-mediated isothermal amplification assays for rapid detection of Arcobacter species. *J Clin Microbiol.* 2014;52(2):557-63.
30. Fallahi S, Seyyed Tabaei SJ, Pournia Y, Zebardast N, Kazemi B. Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and nested-PCR assay targeting the RE and B1 gene for detection of *Toxoplasma gondii* in blood samples of children with leukaemia. *Diagn Microbiol Infectious Dis.* 2014;79(3):347-54.

31. Cadioli FA, Fidelis Junior OL, Sampaio PH, dos Santos GN, Andre MR, Castilho KJ, et al. Detection of *Trypanosoma vivax* using PCR and LAMP during aparasitemic periods. *Vet Parasitol.* 2015;214(1-2):174-7.
32. Song J, Mauk MG, Hackett BA, Cherry S, Bau HH, Liu C. Instrument-Free Point-of-Care Molecular Detection of Zika Virus. *Anal Chem.* 2016;88(14):7289-94.
33. Yaren O, Alto BW, Gangodkar PV, Ranade SR, Patil KN, Bradley KM, et al. Point of sampling detection of Zika virus within a multiplexed kit capable of detecting dengue and chikungunya. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):293.
34. Lamb LE, Bartolone SN, Tree MO, Conway MJ, Rossignol J, Smith CP, et al. Rapid Detection of Zika Virus in Urine Samples and Infected Mosquitos by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Sci Rep.* 2018;8(1):3803.
35. Sabalza M, Yasmin R, Barber CA, Castro T, Malamud D, Kim BJ, et al. Detection of Zika virus using reverse-transcription LAMP coupled with reverse dot blot analysis in saliva. *PLoS One.* 2018;13(2):e0192398.
36. Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PV, Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in medical virology.* 2008;18(6):407-21.
37. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(8):1232-9.
38. Priye A, Bird SW, Light YK, Ball CS, Negrete OA, Meagher RJ. A smartphone-based diagnostic platform for rapid detection of Zika, chikungunya, and dengue viruses. *Sci Rep.* 2017;7:44778.
39. Newman CM, Dudley DM, Aliota MT, Weiler AM, Barry GL, Mohns MS, et al. Oropharyngeal mucosal transmission of Zika virus in rhesus macaques. *Nat Commun.* 2017;8(1):169.
40. Malamud D, Abrams WR, Barber CA, Weissman D, Rehtanz M, Golub E. Antiviral activities in human saliva. *Adv Dent Res.* 2011;23(1):34-7.

APPENDIX – Demographic data, signal and symptoms and LAMP results

Subjects	LAMP		Demographic Data		Signals and symptoms						
	Saliva Tp (mm:ss)	Urine Tp (mm:ss)			Rash	Fever	Conjunctivitis	Arthralgia	Myalgia	Headache	Edema
1	15:00	ND	43	F	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No
2	16:45	15:15	30	M	No	No	Yes	No	Yes	No	No
3	11:45	ND	34	F	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No
4	14:15	ND	42	F	Yes	No	No	No	Yes	Yes	No
5	09:30	19:00	28	F	Yes	No	No	No	No	No	No
6	11:15	ND	53	M	Yes	No	No	Yes	No	No	No
7	10:30	16:14	47	F	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No
8	ND	ND	31	F	Yes	No	No	No	Yes	No	No
9	07:45	ND	57	F	No	No	No	Yes	No	Yes	No
10	ND	20:30	30	F	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No
11	21:00	ND	31	M	Yes	Yes	No	No	No	No	No
12	12:15	ND	12	M	Yes	No	Yes	No	No	No	No
13	ND	13:15	4	F	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No
14	11:30	16:00	34	F	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes
15	14:00	13:15	51	F	Yes	No	No	No	No	Yes	No
16	ND	ND	36	F	No	Yes	No	No	Yes	Yes	No
17	13:00	07:45	35	F	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No
18	11:45	10:00	49	F	No	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes
19	07:15	17:00	32	F	No	Yes	No	No	Yes	Yes	No
20	07:30	17:30	19	F	No	Yes	No	Yes	Yes	No	No
21	11:00	11:00	42	M	Yes	No	No	No	No	Yes	No
22	08:45	14:45	37	F	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No
23	11:30	17:30	22	F	No	Yes	No	No	Yes	No	No
24	09:30	12:15	29	F	Yes	No	No	No	No	No	No
25	10:15	16:00	33	F	Yes	No	No	No	No	No	No
26	08:30	ND	43	M	No	Yes	No	No	Yes	No	No
27	08:30	ND	48	F	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No
28	08:15	16:15	41	F	No	No	No	Yes	No	Yes	No
29	15:45	ND	54	F	No	No	Yes	Yes	No	No	No
30	19:45	ND	35	F	No	No	Yes	No	Yes	Yes	No
31	09:45	ND	39	F	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes	No
32	08:30	ND	40	F	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No
33	ND	ND	32	M	No	Yes	No	No	Yes	No	No
34	17:30	ND	33	F	Yes	No	No	No	Yes	Yes	No
35	12:30	ND	26	M	Yes	Yes	Yes	No	No	No	Yes
36	15:00	ND	57	F	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes
37	12:30	ND	33	F	No	No	No	Yes	No	No	No
38	12:30	18:00	75	F	No	Yes	No	No	Yes	No	No
39	ND	ND	8	M	Yes	No	No	No	No	Yes	No
40	ND	ND	44	M	Yes	No	Yes	No	No	No	No
41	12:45	ND	14	F	Yes	No	No	No	Yes	No	No
42	ND	ND	25	F	No	Yes	No	No	No	Yes	No
43	ND	x	37	F	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No
44	ND	ND	34	M	Yes	No	No	No	No	No	No
45	ND	ND	41	M	No	No	No	Yes	No	Yes	No
46	ND	ND	22	F	Yes	No	No	No	Yes	No	No
47	11:45	15:00	23	M	No	Yes	No	No	Yes	Yes	No
48	15:30	ND	33	F	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes	No
49	17:45	20:00	57	F	Yes	Yes	Yes	No	No	No	Yes
50	ND	ND	23	M	Yes	Yes	No	Yes	No	Yes	No
51	ND	x	40	M	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No
52	ND	x	11	M	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes	No
53	ND	09:00	48	F	No	Yes	No	No	Yes	No	No
54	ND	x	33	M	Yes	No	No	Yes	Yes	No	Yes
55	ND	ND	24	F	No	No	No	Yes	No	No	No
56	ND	x	22	F	No	No	No	Yes	Yes	No	No
57	ND	x	38	F	No	No	No	Yes	No	Yes	Yes
58	20:00	ND	32	M	No	No	No	Yes	No	No	Yes
59	10:45	ND	20	F	Yes	No	No	No	No	No	No
60	ND	ND	43	M	No	Yes	No	No	No	No	No
61	10:45	ND	56	M	No	No	No	Yes	No	No	No
62	15:00	ND	11	F	No	Yes	No	No	Yes	Yes	No
63	21:15	18:15	12	M	Yes	Yes	No	No	No	No	No
64	20:00	ND	41	F	No	Yes	No	No	No	Yes	No
65	12:30	ND	18	F	Yes	No	No	Yes	Yes	No	No
66	ND	ND	56	M	Yes	No	No	Yes	No	No	No
67	ND	ND	46	M	Yes	No	No	Yes	No	Yes	No
68	ND	09:45	37	F	No	No	No	Yes	No	No	No
69	x	ND	29	F	No	No	No	Yes	No	No	No

ATTACHMENTS – Ethics Committee of the University of São Paulo, School of Dentistry



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Rápido diagnóstico do Zika vírus através da saliva e do sangue

Pesquisador: Marina Helena Cury Gallottini

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 60940316.7.1001.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.774.973

Apresentação do Projeto:

O Zika vírus (ZIKV) é um vírus RNA de fita única transmitido entre humanos preferencialmente pelo mosquito Aedes aegypti. Em 2015, o Brasil sofreu um surto expressivo do ZIKV, que gerou preocupação devido à possibilidade do vírus estar relacionado com a síndrome de Guillain-Barré, com a microcefalia e com outras má formações em recém-nascidos de mães infectadas durante a gravidez. O RNA do ZIKV desaparece da circulação sanguínea em aproximadamente uma semana e os anticorpos são detectados pouco tempo depois. Entretanto, o vírus persiste latente por períodos maiores em reservatórios, como na saliva. A hipótese deste estudo é que o Zika vírus pode ser rapidamente identificado através da análise salivar.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo desse estudo é validar o sistema de microfluidos através da Amplificação Mediada por Circuito Isotérmico no dispositivo Rheonix® CARD para detectar rapidamente o RNA do ZIKV e os anticorpos anti-Zika em amostras de saliva e sangue de indivíduos na fase aguda da infecção pelo Zika vírus.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Neste estudo, não haverá contato direto com os participantes, já que as amostras de saliva e de sangue que serão analisadas já foram coletadas previamente, como parte da pesquisa conduzida por pesquisadores do Instituto de Medicina Tropical (IMT) da USP, e previamente aceito pelo

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227	CEP: 05.508-900
Bairro: Cidade Universitária	
UF: SP	Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960	Fax: (11)3091-7814
E-mail: cepfo@usp.br	



**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**



Continuação do Parecer: 1.774.973

Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP (Número do Parecer: 1.681.183).

Não haverá nenhum benefício direto aos participantes da pesquisa

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não há conflito ético na pesquisa. As amostras que serão utilizadas pertencem ao Biorrepositório da Profa. Dra. Ester Cerdeira Sabino, cujo trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, número do parecer 1.581.183

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados:

Folha de rosto

Projeto

Declaração da Co-participante

Declaração do biorrepositório

carta do co orientador

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJECTO_798954.pdf	11/10/2016 15:51:47		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_Coorientador.pdf	11/10/2016 11:20:26	Talita de Castro Alves	Aceito
Declaração de Manuseio Material	Biorrepositorio_Ester.pdf	11/10/2016 11:18:19	Talita de Castro Alves	Aceito

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

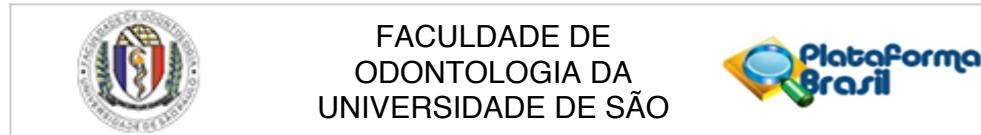
CEP: 05.508-900

UF: SP **Município:** SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br



Continuação do Parecer: 1.774.973

Biológico / Biorepository / Biobanco	Biorrepositorio_Ester.pdf	11/10/2016 11:18:19	Talita de Castro Alves	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_coparticipante.pdf	11/10/2016 11:18:05	Talita de Castro Alves	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Plano_de_Estudo.pdf	11/10/2016 11:16:42	Talita de Castro Alves	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	11/10/2016 11:16:20	Talita de Castro Alves	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

SAO PAULO, 14 de Outubro de 2016

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazovic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227	CEP: 05.508-900
Bairro: Cidade Universitária	
UF: SP	Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960	Fax: (11)3091-7814
	E-mail: cepfo@usp.br

ATTACHMENT – National Ethics Committee for Research (CONEP-Brasil)

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Rápido diagnóstico do Zika vírus através da saliva e do sangue

Pesquisador: Marina Helena Cury Gallottini

Área Temática: A critério do CEP

Versão: 4

CAAE: 60940316.7.1001.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.885.522

Apresentação do Projeto:

INTRODUÇÃO

O Zika vírus (ZIKV) é um vírus da família Flaviviridae, gênero Flavivirus, transmitido entre humanos preferencialmente pelo mosquito da espécie Aedes e principalmente pelo A. aegypti. O ZIKV é um vírus RNA de fita única com genoma que codifica uma única proteína que é dividida em três proteínas estruturais (C, prM/M, E) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4, NS4B e NS5). Em 2015, o Brasil sofreu um surto expressivo do ZIKV, que rapidamente se disseminou pelas Américas. Os primeiros casos brasileiros reportados apresentaram sintomas semelhantes aos da gripe pela infecção pelo Flavivirus, como febre, rash cutânea, dor de cabeça, conjuntivite, mialgia e alergia. Entretanto, esta epidemia gerou preocupação devido à possibilidade do ZIKV estar relacionado com a síndrome de Guillain-Barré, além da microcefalia e de outras má-formações em recém-nascidos de mães infectadas durante a gravidez. O ZIKV geralmente permanece no sangue por aproximadamente uma semana, e 1 a cada 5 indivíduos (20%) infectados irão manifestar os sintomas. O RNA viral parece desaparecer da circulação sanguínea em aproximadamente uma semana e os anticorpos são detectados pouco tempo depois. Entretanto, o vírus persiste latente por períodos maiores (meses ou mais) em reservatórios, como o sêmen e saliva. O ZIKV foi detectado primeiramente na saliva durante a epidemia de 2013 na Polinésia Francesa. Musso et al., 2015 observaram que vários pacientes que apresentavam

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.750-521

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5878

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.885.522

sintomas específicos da infecção por Zika eram negativos para o ZIKV em amostras de sangue analisadas por PCRtempo real. O grupo de pesquisadores resolveu então, coletar a saliva de uma criança de 1 ano de idade que apresentava sintomas de uma infecção por Zika e a amostra foi positiva. Desde então, estudos têm postulado que a saliva é uma importante alternativa para detectar o ZIKV, já que o ácido nucléico é mais frequentemente identificado na saliva do que em amostras de sangue, quando analisadas por PCR. O PCR (Polymerase Chain Reaction) tem sido amplamente utilizado em análises de microfluídos para amplificar DNA e RNA. Entretanto, estudos utilizando o método de amplificação isotérmica, principalmente a Amplificação Mediada por Circuito Isotérmico (LAMP em inglês) tem atraído a atenção devido a sua rapidez, simplicidade, sensibilidade e habilidade de amplificar tanto DNA como RNA. Chen e colegas desenvolveram e aprimoraram um dispositivo rápido e portátil de microfluídos CARD para detectar simultaneamente anticorpos anti-HIV e RNA viral do hospedeiro em um mesmo espécime utilizando saliva e sangue. Um ensaio de LAMP para análises moleculares e um teste comercial sorológico otimizado foram incorporado ao dispositivo Rheonix® CARD. Atualmente, o mesmo grupo de pesquisadores está trabalhando com o Rheonix® para adaptar a atual metodologia CARD em um diagnóstico confirmatório do ZIKV utilizando amostras de saliva e sangue para detectar ambos, ZIKV RNA e anticorpos anti-Zika. O dispositivo irá permitir uma rápida identificação dos indivíduos infectados e distinguirá entre infecções recentes e tardias.

HIPÓTESE

A hipótese deste estudo é que o RNA do Zika vírus pode ser rapidamente identificado através da análise salivar.

METODOLOGIA

Em maio de 2016, amostras de saliva e de sangue foram coletadas de 50 participantes apresentando sintomas específicos da infecção por Zika, no Brasil. As amostras foram armazenadas no Biorrepositório da profa. Ester Cerdeira Sabino do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo (IMTSP-USP) e serão analisadas neste presente estudo.

Este projeto será submetido para aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia da Universidade da São Paulo (FOUSP). Dados demográficos e da história médica dos voluntários foram obtidos.

Ao todo, 50 amostras de 200L, serão fornecidas pelo Biorrepositório. Neste estudo, todo o conteúdo de todas as amostras serão utilizadas e analisadas no Departamento de Ciências Básicas,

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde	
Bairro: Asa Norte	CEP: 70.750-521
UF: DF	Município: BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878	E-mail: conept@saude.gov.br

**COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA**



Continuação do Parecer: 1.885.522

da Faculdade de Odontologia da Universidade de Nova York (NYU). Não haverá portanto, amostras ou volume de amostras sobressalente ao final deste estudo.

O RNA e os anticorpos do ZIKV serão simultaneamente detectados e quantificados por pesquisadores da empresa Rheonix®, localizada em Ithaca, Nova York. A carga viral será quantificada utilizando a LAMP no capsídeo gênico do ZIKV. Os primers selecionados são para as regiões do RNA distintas das sequências que são intimamente relacionadas com os vírus da Dengue e Chikununya. Para detectar os anticorpos específicos do ZIKV, serão utilizados peptídeos dos 3 vírus relacionados (Zika, Dengue e Chikungunya) transmitidos pela mesma espécie de mosquito. Assim que os peptídeos do ZIKV forem identificados, nós solicitaremos os peptídeos relevantes e criaremos um microensaio para incorporar ao Rheonix® CARD e para detectar os anticorpos anti-Zika.

Cada dispositivo Rheonix® CARD pode analisar 4 amostras simultaneamente, permitindo controles negativos e/ou a diluição seriada da amostra.

Para analisar o ZIKV nós vamos utilizar um microensaio de 3抗ígenos virais marcados com a detecção do anticorpo.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO

O objetivo desse estudo é validar o sistema de microfluidos através da Amplificação Mediada por Circuito Isotérmico no dispositivo Rheonix® CARD para detectar rapidamente o RNA do ZIKV e os anticorpos anti-Zika em amostras de saliva e sangue de indivíduos na fase aguda da infecção pelo Zika vírus.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

Neste estudo, não haverá contato direto com os participantes, já que as amostras de saliva e de sangue que serão analisadas já foram coletadas previamente, como parte da pesquisa conduzida por pesquisadores do Instituto de Medicina Tropical (IMT) da USP, e previamente aceito pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP (Número do Parecer: 1.681.183)

BENEFÍCIOS

Não haverá nenhum benefício direto aos participantes da pesquisa.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde	CEP: 70.750-521
Bairro: Asa Norte	
UF: DF	Município: BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878	E-mail: conept@saude.gov.br

**COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA**



Continuação do Parecer: 1.885.522

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

TRATA-SE DE ANÁLISE DE RESPOSTA AO PARECER CONEP 1.848.508.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Verificar item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

Verificar item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

TRATA-SE DE ANÁLISE DE RESPOSTA AO PARECER CONEP 1.848.508:

1. Quanto ao documento intitulado "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_798954.pdf":

1.1. A justificativa para pedido de dispensa de TCLE não é plausível, uma vez que as amostras serão utilizadas em outro estudo e, para tanto, exige-se: a) apresentação do novo projeto de pesquisa para ser analisado pelo sistema CEP/CONEP e b) obrigatoriamente, ao reconsentimento do participante de pesquisa por meio de um TCLE específico referente ao novo projeto de pesquisa (Resolução CNS 441/11, item 6 e Portaria MS 2201/11, capítulo II, artigo 5 e capítulo IV, seção II, artigos 17, 18 e 22). Solicita-se a inclusão do TCLE.

RESPOSTA: Nesta pesquisa, não haverá nenhum contato direto com os participantes, e sim a transferência de amostras de material biológico humano armazenadas em Biorrepositório. As amostras de material biológico que serão utilizadas neste estudo fazem parte de um Biorrepositório de pesquisa anterior intitulada “Metagenômica viral de Dengue, Chikungunya e Zika vírus: Acompanhar, explicar e prever a transmissão e distribuição espaço-temporal no Brasil” aprovada previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, número do parecer 1.581.183. Neste estudo, todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido contendo a formalização da autorização de armazenamento e utilização de material biológico, dispensando um novo consentimento para futuras pesquisas. O modelo de TCLE utilizado neste estudo prévio foi anexado à Plataforma Brasil (nome do documento: TCLE 1581183) e todos os TCLEs assinados pelos participantes e que participarão desta presente pesquisa estão arquivados. De acordo com o Item 9.I da resolução CNS no441 de 12 de maio de 2011, o gerenciamento do material biológico humano armazenado em Biorrepositório cabe ao pesquisador responsável, por isso a carta de Autorização do Biorrepositório da pesquisadora Ester Cerdeira Sabino foi anexada previamente. Além disso, de

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde	CEP: 70.750-521
Bairro: Asa Norte	
UF: DF	Município: BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878	E-mail: conept@saude.gov.br

**COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA**



Continuação do Parecer: 1.885.522

acordo com o item IV.8 da resolução CNS no466 de 2012, nos casos em que seja inviável a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, a dispensa do TCLE deve ser justificadamente solicitada pelo pesquisador responsável ao Sistema CEP/CONEP, para apreciação, sem prejuízo do posterior processo de esclarecimento. Os participantes desta pesquisa são apenas parte de um total de participantes da pesquisa conduzida em outro Estado do Brasil, portanto é inviável um novo contato direto com cada um desses participantes. Esta justificativa também será adicionada à Plataforma Brasil no item Justificativa – Dispensa do TCLE.

ANÁLISE: Pela definição de biorrepositório, o uso das amostras sem novo consentimento só se aplica ao mesmo estudo (apenas em caso de Biobanco pode haver dispensa de novo consentimento), o que aqui, evidentemente não é o caso, ainda que consideremos que os objetivos ditos principais são abrangentes e aplicáveis a uma grande gama de estudos sobre o tema. Ao se cotejar os objetivos dos dois estudos relacionados, tem-se que o principal visa: "Acompanhar, explicar e prever a transmissão e distribuição espaço-temporal no Brasil", enquanto o estudo em tela propõe: "O objetivo desse estudo é validar o sistema de microfluidos através da Amplificação Mediada por Circuito Isotérmico no dispositivo Rheonix® CARD para detectar rapidamente o RNA do ZIKV e os anticorpos anti-Zika em amostras de saliva e sangue de indivíduos na fase aguda da infecção pelo Zika vírus". Se os investigadores propõem um novo estudo, com objetivo bastante mais detalhado, é imperioso novo consentimento. PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA, inviabilizando a execução do protocolo sem nova abordagem aos participantes que cederam suas amostras, salvo se todas as amostras utilizadas vierem de Biobanco já aprovado pela Conep e de participantes que optaram por não ser contactados a cada nova pesquisa.

RESPOSTA: Todas as amostras dos participantes desta pesquisa foram incluídas no Biobanco do Instituto de Medicina Tropical (Número de Registro Conep B- 016). Uma carta de autorização do Biobanco atestando o fornecimento das 50 amostras que serão utilizadas nesta pesquisa, assinada pelo Coordenador responsável do Biobanco, foi anexada à Plataforma Brasil ("Autorização Biobanco"). As amostras serão fornecidas apenas após a aprovação deste projeto de pesquisa. Somente participantes que optaram por não ser contatados a cada nova pesquisa serão incluídos. Propõe-se, portanto, dispensa de novo TCLE.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.2. Na metodologia proposta há explicação sobre o envio do material biológico humano para o Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia da Universidade de Nova York (NYU). Se faz necessário que seja apresentado documento de acordo entre as instituições

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde	CEP: 70.750-521
Bairro: Asa Norte	
UF: DF	Município: BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878	E-mail: conept@saude.gov.br

**COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA**



Continuação do Parecer: 1.885.522

participantes contemplando operacionalização, compartilhamento e utilização do material biológico humano armazenado em Biorrepositório, inclusive apresentando a possibilidade de dissolução futura da parceria e consequente partilha e destinação dos dados e materiais armazenados (Resolução CNS 441/11, item 13; Portaria MS 2201/11, capítulo IV, seção II, artigo 19). Solicita-se inclusão do documento.

RESPOSTA: Solicitou-se a inclusão do documento de acordo de participação entre todas as instituições participantes do estudo, contemplando a operacionalização, compartilhamento e utilização do material biológico humano armazenado em Biorrepositório, inclusive apresentando a possibilidade de dissolução futura da parceria e consequente partilha e destinação dos dados e materiais armazenados. Este documento foi anexado à Plataforma Brasil com o nome de arquivo "Carta entre instituições". A versão em língua inglesa, enviada para o professor no exterior também foi anexada como "Cooperation Agreement".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.3. Cabe ressaltar que, de acordo com o item V da Resolução CNS 466/2012, "considera-se que toda pesquisa envolvendo seres humanos envolve risco. O dano eventual poderá ser imediato ou tardio, comprometendo o indivíduo ou a coletividade". Ressalte-se ainda o item II.22 da mesma resolução que define como "Risco da pesquisa - possibilidade de danos à dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano, em qualquer pesquisa e dela decorrente". Solicita-se adequação apontando os riscos (colocar os riscos possíveis detectados).

RESPOSTA: Os riscos desta pesquisa serão mínimos já que não haverá contato direto com os participantes e sim transferência e análise de amostras de material biológico humano armazenadas em Biorrepositório. Riscos com relação a identificação pessoal dos participantes são mínimos, mas podem porventura ocorrer. Esta afirmação foi adicionada à Plataforma Brasil, no item Riscos - Detalhamento do Estudo.

ANÁLISE: O investigador limita-se a qualificar os riscos como "mínimos", sem detalhar quais são.
PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA.

RESPOSTA: Os riscos desta pesquisa serão mínimos já que não haverá contato direto com os participantes e sim transferência e análise de amostras de material biológico humano armazenadas em Biobanco. Riscos com relação a identificação pessoal dos participantes, assim como danos à dimensão psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual dos participantes, podem porventura ocorrer. Esta afirmação foi adicionada à Plataforma Brasil, no item

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde	CEP: 70.750-521
Bairro: Asa Norte	
UF: DF	Município: BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878	E-mail: conept@saude.gov.br

**COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA**



Continuação do Parecer: 1.885.522

Riscos - Detalhamento do Estudo.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Como o pesquisador desenvolverá o estudo com material de biorrepositório, deve apresentar documento, devidamente assinado, atestando o compromisso de que toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado será submetida à aprovação do CEP institucional e, quando for o caso, da CONEP (Resolução 441/11, item 2.III). Para cada novo projeto será necessário um novo TCLE. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: O documento anexado previamente à Plataforma Brasil, intitulado “Biorrepositório Ester” atesta o fornecimento das amostras para a realização desta pesquisa apenas após aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa institucional. O documento está devidamente assinado pela responsável do Biorrepositório Ester Cerdeira Sabino. Esta pesquisa dispensa Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme justificativa na “Resposta referente à pendência 1.1”.

ANÁLISE: Conforme já expresso na análise da resposta à inadequação 1 deste parecer, considera-se pelos motivos já expostos, a PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA.

RESPOSTA: De acordo com a nova Resposta referente à inadequação 1.1 deste parecer, adequamos o fornecimento das amostras através de um Biobanco aprovado pelo Conep e anexamos o documento assinado referente à autorização do Biobanco. Essas amostras serão fornecidas e utilizadas apenas após a aprovação pelo CEP-FOUUSP e Conep. Propõe-se, portanto, dispensa de novo TCLE.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3. A instituição que receberá o material biológico humano no exterior deve apresentar documento garantindo ao pesquisador e à instituição brasileiros o direito de acesso e utilização do material biológico humano armazenado no exterior (e não apenas das amostras depositadas pelo pesquisador). Deve ser garantida, no mínimo, a proporcionalidade na participação e deve ser apresentado o compromisso da instituição destinatária no exterior quanto à vedação do patenteamento e da utilização comercial de material biológico humano, em atenção à normativa brasileira, em especial, ao item 14 da Resolução 441/11, capítulo IV, seção I, artigos 11 e 12. Solicita-se inclusão da declaração da instituição estrangeira com as devidas garantias.

RESPOSTA: Solicitou-se um documento garantindo ao pesquisador e à instituição brasileiros o direito de acesso e utilização do material biológico humano que eventualmente poderá ser armazenado no exterior. Garantindo-se também a proporcionalidade na participação e

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde	
Bairro: Asa Norte	CEP: 70.750-521
UF: DF	Município: BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878	E-mail: conept@saude.gov.br

**COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA**



Continuação do Parecer: 1.885.522

compromisso quanto a vedação do patenteamento e da utilização comercial do material biológico humano. Foi incluída como anexo a declaração da instituição estrangeira com as devidas garantias, bem como a versão traduzida da mesma (MTA e MTA traduzido). Conforme explicitado no item Metodologia Proposta – Detalhamento do Estudo da Plataforma Brasil, todas as amostras de material biológico humano e o todo o conteúdo delas será utilizado e analisado durante esta pesquisa. Não haverá, portanto, material biológico humano sobressalente que será armazenado e/ou utilizado em pesquisas futuras. Por isso, também não será possível o patenteamento e a utilização comercial de material biológico humano, já que todas as amostras serão utilizadas durante esta pesquisa. Mesmo assim, incluímos o documento com as garantias solicitadas e a declaração de que, caso haja amostra sobressalente, estas serão descartadas após a conclusão desta pesquisa.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJECTO_798954.pdf	20/12/2016 14:44:30		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Plano_de_Estudo.pdf	19/12/2016 14:06:50	Talita de Castro Alves	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Autorizacao_Biobanco.pdf	19/12/2016 14:05:45	Talita de Castro Alves	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Cooperation_Agreement.pdf	19/12/2016 14:05:26	Talita de Castro Alves	Aceito
Declaração de	Carta_entre_instituicoes.pdf	19/12/2016	Talita de Castro	Aceito

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

Bairro: Asa Norte

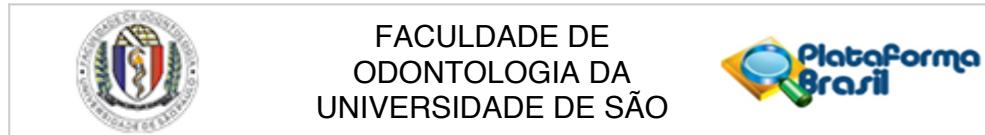
CEP: 70.750-521

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5878

E-mail: conept@saude.gov.br



Continuação do Parecer: 1.774.973

<u>Biológico / Biorepositorio / Biobanco</u>	Biorrepositorio_Ester.pdf	11/10/2016 11:18:19	Talita de Castro Alves	Aceito
<u>Declaração de Instituição e Infraestrutura</u>	Declaracao_coparticipante.pdf	11/10/2016 11:18:05	Talita de Castro Alves	Aceito
<u>Projeto Detalhado / Brochura Investigador</u>	Plano_de_Estudo.pdf	11/10/2016 11:16:42	Talita de Castro Alves	Aceito
<u>Folha de Rosto</u>	Folha_de_Rosto.pdf	11/10/2016 11:16:20	Talita de Castro Alves	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

SAO PAULO, 14 de Outubro de 2016

Assinado por:

Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227	CEP: 05.508-900
Bairro: Cidade Universitária	
UF: SP	Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960	Fax: (11)3091-7814
	E-mail: cepfo@usp.br